

## 한국 재래 간장에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는 $\alpha$ -galactosidase의 특성 및 작용양상

최 청\* · 최광수 · 이선호 · 홍승표 · 이희덕 · 배두경

영남대학교 식품가공학과

**초 록** : 한국 재래 간장으로부터 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는  $\alpha$ -galactosidase의 최적 생산조건은 tryptone 1.5%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2%, raffinose 2.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%, yeast extract 0.5%, pH 7.0, 27°C에서 3일간 배양했을 때였다.  $\alpha$ -galactosidase의 최적 pH는 7.0, 최적온도는 27°C였으며, pH 6.0~8.0범위와 40°C이하에서 안정하였다.  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  등의 금속이온 및 p-chloromercuribenzoic acid, Iodine에 의해 강하게 저해되어 본 효소의 catalytic부위에 -SH기가 있음이 추정되었다. Km값은 1.9 mM, Vmax값은  $9.66 \times 10^2 \mu\text{M}/\text{min}$ 이었다. 배양기간에 따른 raffinose의 분해양상을 high performance liquid chromatography로 살펴본 결과 배양초기에 raffinose가 분해되어 sucrose, glucose, fructose가 관찰되었다. 배양기간이 경과함에 따라 raffinose가 감소하였고 sucrose, glucose, fructose도 소실됨을 확인하였다.(1998년 8월 25일 접수, 1998년 11월 25일 수리)

### 서 론

우리 나라 전통 간장에 대하여서는 간장 제조에 관여하는 미생물 군에 대한 연구등 상당한 결과<sup>1)7)</sup>가 보고되었다. 그러나 가정이나 사찰에서는 여전히 자연접종된 미생물로 메주를 만들고 간장을 담그고 있으며, 장류회사에서는 일본 간장 미생물인 *Aspergillus oryzae*나 *Aspergillus sojae*를 접종한 메주로 간장을 제조하고 있어 전통 간장제품의 제조 조건에 부합되는 특성을 가진 우수균주의 개발은 절실한 실정이다. 이에 저자들은 전통 간장 대량생산 시에 필요한 주요간장 미생물을 선정하기 위한 일환으로 메주에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*의 대두단백질 분해력을 조사하여 발표한 바 있다.<sup>7)</sup>

우리 조상들은 식생활중 콩을 원료로 한 식품들을 많이 이용하여 왔다. 그 중에서 장류 제품들의 원료가 콩이었으며 식생활중 경험적 기술을 토대로하여 재래식 전통 발효 식품을 제조하여 왔다. 간장제조용 메주의 원료인 대두 중에는 주로 raffinose와 stachyose등의 소당류가 존재하는데 이들을 발효성당으로 분해하여 이용하기 위해서는  $\alpha$ -galactosidase가 작용하여야 하며,  $\alpha$ -galactosidase는  $\alpha$ -1,6-galactoside결합을 갖고 있는 당을 가수분해하는 exo형 효소로서 제당공업, 대두가공품의 품질 향상등에 이용되고 있다. 그러나 인체내에서는  $\alpha$ -galactosidase가 존재하지 않기 때문에 대두중의 이러한 소당류들은 이용되지 않으며, 특히 인체내에서 장내 불편감, 수소, 탄산, 메탄등의 가스생성을 유발하여 복부 팽만감을 주는 원인이 되며, 장내에서의 가스생성은 구역질, 복통, 설사를 야기한다고 보고되고 있다.<sup>8,15)</sup>

본 연구에서는 메주콩내의 주요 당류인 raffinose와 stach-

yose 등의 소당류를 분해하여 발효성 당을 생산하는 효소인  $\alpha$ -galactosidase의 특성과 작용양상을 규명하여 전통장류의 산업화를 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

공시균은 전보<sup>7)</sup>에서 사용한 균으로 메주에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*를 계대배양하여 보관하며 사용하였다.

#### 효소생산을 위한 배지 및 배양방법

Czapek-Dox broth에서 예비 배양한 후 효소생산용배지 (tryptone 1.5%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2%, raffinose 2.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%, yeast extract 0.5%)에 1% 되게 접종하여 27°C에서 3일간 배양하였다.

#### 효소 생산 조건

효소 생산에 미치는 배지의 조성 및 조건을 조사하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염류, 초기 pH, 온도를 조사하였다. 먼저 탄소원은 효소생산배지에 각 탄소원을 2%되게 조정하여 27°C에서 3일간 배양한 후  $\alpha$ -galactosidase 활성을 측정하였으며, 유기질소원은 1%, 무기질소원은 1%, 무기염류는 0.5% 되도록 조정하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 초기 pH는 4~10, 배양온도는 20~40°C 범위에서 효소생산용 배지에서 실시하였다.

#### 조효소의 제조

배양된 배지를 원심 분리하여 상정액에 황산암모늄을 70%

찾는말 : *Scopulariopsis brevicaulis*,  $\alpha$ -galactosidase, soy sauce

\*연락처

포화시켜 효소단백을 응집, 침전시키고 원심 분리하여 효소단백을 회수하였으며, 회수된 효소단백질은 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)으로 투석하여 동결 건조하였다. 동결 건조된 조효소를 Sephadex G-25를 통과시켜 저분자의 불순 물질을 제거한 후 사용하였다.

#### 효소활성 측정법

효소의 활성은 Cruz와 Park의 방법<sup>9)</sup>을 변형하여 측정하였다. 2 mM PNPG를 함유한 0.1 M McIlvaine완충액(pH 7.0) 1 ml에 효소액 1 ml를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5 ml를 가하여 반응을 정지 시킨 다음 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 p-nitrophenol(PNP)의 양을 측정하였다. 효소활성은 PNPG로부터 1분에 1 μmole의 PNP를 유리하였을 때를 1 unit로 하였다.

#### 분해산물의 확인

효소 생산용 배지에 raffinose를 2% 넣은 후 배양 중 raffinose의 분해 양상을 보기 위해 배양간에 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 당류의 변화를 관찰하였다. 배양액을 원심분리한 후 상정액에 mixed bed resin TMD-8(1:1 mixture of strong cation and anion exchange resin, Sigma, U.S.A.)을 가하여 양이온과 음이온 물질을 제거하고 당 분석을 하였다. 이때 HPLC의 분석조건은 column: Rezex RNM, detector: Shimadzu RID-6A, mobile phase: water, Temp.: 75°C이었다.

### 결과 및 고찰

#### 효소 생산을 위한 배양 조건

##### (1) 배양시간에 따른 효소 생산

α-galactosidase 생성을 위한 배지를 이용하여 효소생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 효소활성은 배양 3일째 최대에 도달하였으며 3일이 지나면서부터 효소활성이 관찰되었다. Chun 등<sup>10)</sup>은 *Aspegillus niger*가 생성하는 α-galactosidase의 활성은 120시간 배양하였을 때 가장 높았다고 하였으며, Keum 등<sup>10)</sup>은 *A. niger* 유래의 효소는 배양 4일째 활성이 가장 높았다고 보고하였다. Kang 등<sup>10)</sup>은 *Bif. angulatum*은 17시간 배양시, *Bif. longum*은 20시간 배양하였을 때 효소 활성이 최대였다고 하여 배양 방법이나 균주에 따라 차이를 나타내었다.

##### (2) 효소 생산을 위한 온도의 영향

효소 생산용 배지로 온도를 달리하며 효소 생산에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 27°C에서 최대의 생산을 나타내었다. 이와 같은 결과는 *Bif. angulatum*와 *Bif. longum*의 경우 37°C<sup>10)</sup>, *A. oryzae* 50°C, *Scopulariopsis* sp. 65°C, *Penicillium brevicompactum* 50°C, *Aureobasidium pullulans* 55°C에서 최대의 효소 생산을 보였다는 보고<sup>11)</sup>에 비해 낮은 온도였다.

##### (3) 효소 생산을 위한 초기 pH의 영향

초기 pH를 달리 하여 효소 생산을 조사한 결과 pH 6~8

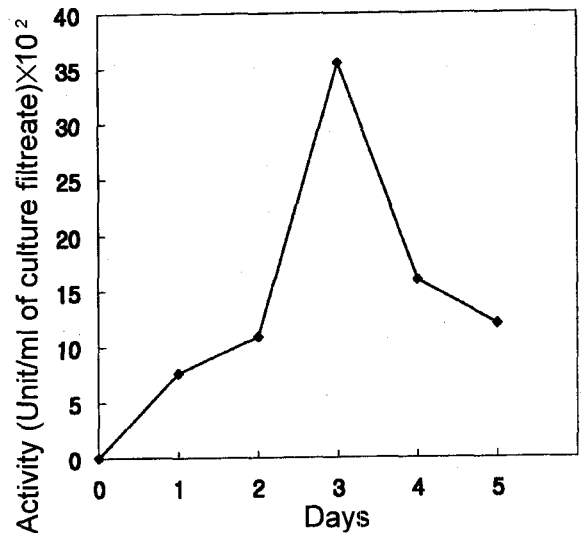


Fig. 1. Time course of α-galactosidase production from *Scopulariopsis brevicaulis*.

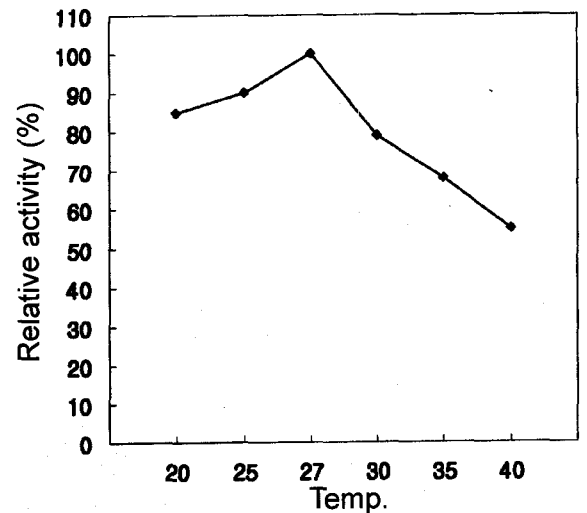


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the α-galactosidase production from *Scopulariopsis brevicaulis*.

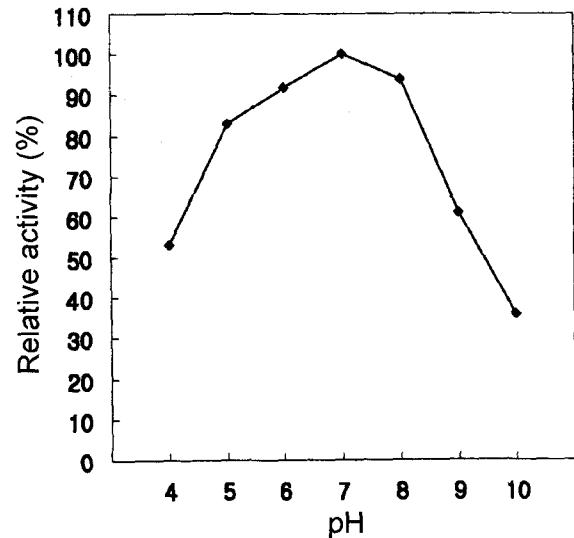
사이에서 효소의 생산이 양호하였으며 pH 7에서 최대의 효소 생산을 보였다. 이는 *Bif. angulatum*와 *Bif. longum*의 경우<sup>10)</sup>와 같은 결과였다.

##### (4) 배지 조성의 영향

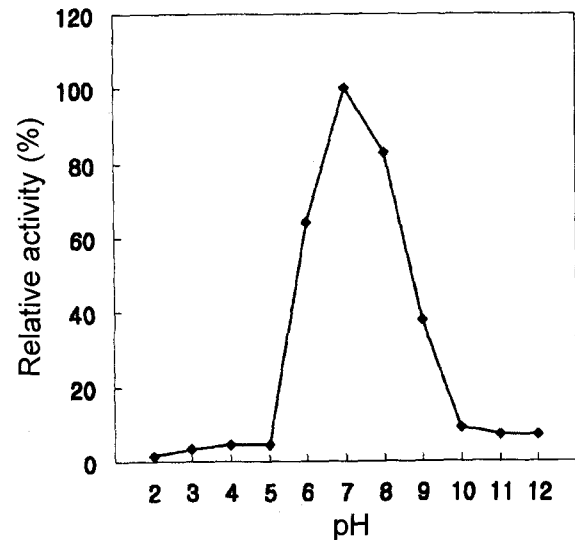
효소의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 각 탄소원을 2%되게 첨가하고 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 raffinose첨가시에 약 211.3%의 활성증가가 있었으며 raffinose의 농도별로 효소 생산성을 조사한 결과 2.5% 첨가 하였을 때 효소 활성이 가장 높았다. Galactose에서도 186.8%정도의 활성증가를 보였으나 다른 탄소원에서는 활성이 증가되지 않았다. 각종 유기질소원을 각 1%씩 배지에 첨가하여 27°C에서 3일간 배양한 결과 Table 1과 같이 tryptone과 yeast extract가 가장 효과적이었으며 tryptone과 yeast extract를 혼합 사용하였을 경우는 생산성이 크게 향상되었다. 무기질소원은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 각종 무기염류에 대한 영향은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 가장 효과적이었다. Cruz와 Park<sup>9)</sup>은 대두유리

**Table 1. Effect of various sources on  $\alpha$ -galactosidase production**

Source	Component	Relative activity (%)
Carbon (2%, w/v)	glucose	108.4
	soluble starch	103.7
	fructose	102.7
	maltose	102.5
	sucrose	104.3
	lactose	104.7
	pectin	102.2
	sorbitol	103.7
	galactose	186.8
	raffinose	211.3
Organic nitrogen (1%, w/v)	peptone	107.5
	soytone	109.1
	beef extract	103.1
	yeast extract	149.3
	tryptone	137.4
	peptone+tryptone	135.5
	peptone+yeast ex.	153.1
	tryptone+yeast ex.	198.2
peptone+soytone	117.6	
Inorganic nitrogen (1%, w/v)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	100.9
	NaNO <sub>2</sub>	103.4
	NaNO <sub>3</sub>	137.0
	CaNO <sub>3</sub>	137.4
	KNO <sub>3</sub>	146.3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.5
Inorganic salt (0.5%, w/v)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	205.9
	FeCl <sub>2</sub>	91.9
	CaCO <sub>3</sub>	80.4
	ZnSO <sub>4</sub>	97.0
	MnSO <sub>4</sub>	96.6
	CuSO <sub>4</sub>	90.8
	MgSO <sub>4</sub>	120.7
	NaCl	157.4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	135.9
KCl	123.8	
Control	None	100.0



**Fig. 3. Effect of initial pH on the  $\alpha$ -galactosidase production from *Scopulariopsis brevicaulis*.**



**Fig. 4. Effect of pH on the activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*.**

의 당, raffinose, stachyose을 첨가했을 때  $\alpha$ -galactosidase생 산성이 높았다고 보고 하였으며, Annunziato 등<sup>18)</sup>은 밀기울 에 sucrose, raffinose, melibiose를 첨가했을 때 효소 생성이 좋았으며 단당류보다는 이당류 이상이 효과적이었다고 보 고 한 바 있다. Kang 등<sup>19)</sup>도 melibiose, galactose가 효과가 좋았다고 보고 하였다. 이들의 결과를 종합하여 볼 때  $\alpha$ -galactosidase생산에 있어서 중요한 영양인자로는 melibiose, raffinose, stachyose와 같은  $\alpha$ -galactoside결합을 가진 당과 galactose가 효과적인 것으로 판단된다.

**효소의 특성**

**(1) 최적 pH 및 안정성**

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일 정량의 조효소액을 각각의 pH(2에서 12)로 조절한 다음, 각 pH별 완충 용액을 첨가한 기질과 40°C에서 10분간 반응시 키고 후 효소활성을 측정하여 Fig. 4와 같다. pH 7.0에서 최대활성을 보였으며 pH 8.0에서 83.1%, pH 6.0에서 64.0

%로 중성부근의 범위에서 비교적 높은 활성을 나타내었다. 효소의 pH안정성을 조사하기 위하여 0.2 M Britton-Robinson buffer(pH 3~12)를 사용하여 각 pH의 buffer 1 ml에 효소 0.5 ml를 가한 다음 30°C에서 1시간 방치한 다음 최적 pH인 7.0으로 조절하고 잔존활성을 측정하여 Fig. 5와 같이 pH 6~8까지 잔존 활성이 비교적 좋았으며 pH 7.0에서 가장 안정하였다. *A. saitoi*<sup>23)</sup>는 pH 5.0~5.5, *Lactobacillus fermentum*<sup>19)</sup>은 pH 5.0~6.5, *A. oryzae*<sup>19)</sup>는 pH 4.0에서 최대의 활성을 나타내었다. 이들의 최적 pH는 본 결과와 비교할 때 산성쪽으로 기울어져 있었다. 그러나 *Cl. cladosporioides*<sup>14)</sup>가 생성하는  $\alpha$ -galactosidase의 최대 활성은 PNP가 기질로 하였을 때 pH 7.0, 대두  $\alpha$ -galactosidase<sup>20)</sup>의 최적작용 pH는 6.0, *A. niger*유래의  $\alpha$ -galactosidase<sup>20)</sup>는 pH 6.5에서 최대의 활성이었다. 대두  $\alpha$ -galactosidase는 약산성에서 안정하였고, *A. niger*유래의  $\alpha$ -galactosidase는 중성에

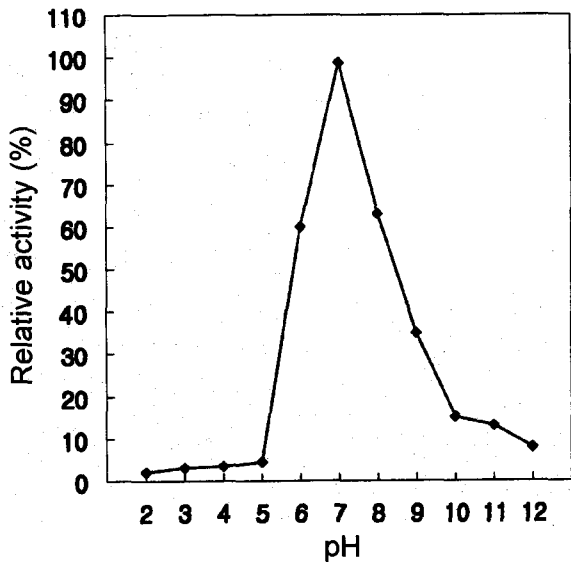


Fig. 5. pH stability of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*.

서 안정하였다고 보고되어 본 실험과 유사하였다.

(2) 최적 작용온도 및 열 안정성

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해 최적 온도를 조사한 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 40°C 부근에서 최대활성을 나타내었으며, 50°C 부근에서는 활성이 급격히 감소하였다. 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 각각의 온도에서 잔존 활성도를 측정된 결과 Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 40°C까지는 안정하였으나, 50°C에서 15분간 열처리하였을 때 효소활성의 급격한 감소가 관찰되어 이 효소는 비교적 열에 약한 것으로 판단되었다. Sugimoto 등<sup>13)</sup>의 연구에서는 55°C에서 최대의 활성을 보였고 70°C에서 30분 방치하였을 때 불활성화되었다. Garro 등<sup>19)</sup>은 *Lactobacillus fermentum*이 생산하는  $\alpha$ -galactosidase의 최적 온도가 45°C였으며 55°C이상에서 활성을 소실하였다고 보

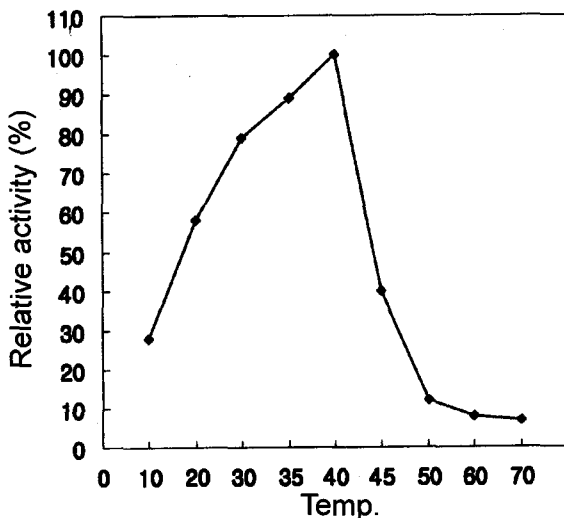


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*.

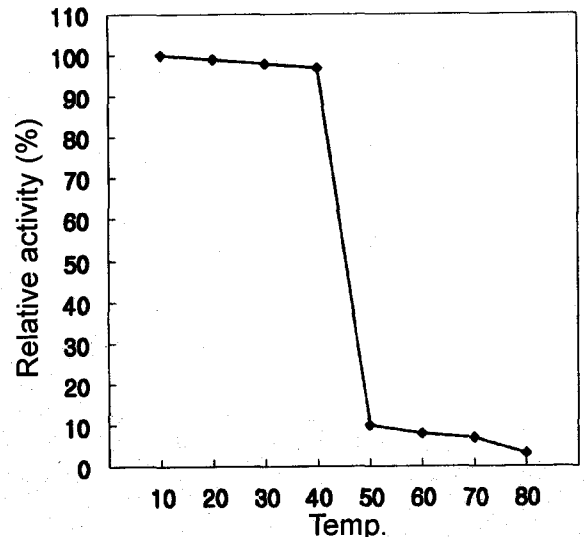


Fig. 7. Temperature stability of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*.

고하였다. *Cl. cladosporioides*<sup>14)</sup>가 생성한  $\alpha$ -galactosidase는 45~60°C에서 활성을 보였으나 더 높은 온도에서는 급격히 불활성화 되었다. *A. oryzae*유래의  $\alpha$ -galactosidase<sup>14)</sup>는 50°C에서 최적 활성을 나타내었으며 30~50°C에서 안정하였다. 본 결과에서는 다른 미생물유래의  $\alpha$ -galactosidase에 비해 비교적 낮은 온도에서 최대의 활성을 나타내었다.

(3) 금속이온의 영향

효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 각종 금속이온을 함유한 시약을 이용해 이들 금속이온의 농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 본 효소는 Mn<sup>2+</sup> 등에 의해서는 활성이 다소 증가하였으나 Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 등에 의해 각각 5.27%, 7.13%, 12.9%, 30.85%의 잔존활성을 보였다. 이는 Sugimoto 등<sup>13)</sup> Garro 등<sup>19)</sup>, Keum<sup>20)</sup>, Chun 등<sup>11)</sup>의 연구와 유사한 양상이었다.

(4) 각종저해제의 영향

효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단

Table 2. Effect of metal ions on the activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*

Ion	Metal	Relative activity (%)
None		100.0
Mn <sup>2+</sup>	MnSO <sub>4</sub>	110.3
Ba <sup>2+</sup>	BaCl <sub>2</sub>	101.2
Fe <sup>2+</sup>	FeSO <sub>4</sub>	100.7
Pb <sup>2+</sup>	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	103.2
Ca <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	96.4
K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	94.7
Mg <sup>2+</sup>	MgSO <sub>4</sub>	95.5
Zn <sup>2+</sup>	ZnSO <sub>4</sub>	30.8
Cu <sup>2+</sup>	CuSO <sub>4</sub>	12.0
Ag <sup>2+</sup>	AgNO <sub>3</sub>	7.1
Hg <sup>2+</sup>	HgCl <sub>2</sub>	5.2

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml metal ion solution (2 × 10<sup>-3</sup> M), was incubated at 4°C for 60 min and th residual activities were assayed.

아미노산이 효소활성부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-DNP를 증류수에 용해하여  $2.0 \times 10^{-2}$  M로 만들고 2,4-DNP용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml을 혼합하여 4°C에서 60분간 전처리한 후 활성을 측정한 결과 Table 3에서와 같이 저해가 일어나지 않았다. 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA를 처리하여 위하여 효소활성을 측정한 결과에서도 Table 3에서와 같이 저해가 일어나지 않았다. 효소 분자중 SH기 저해제로 알려진 PCMB의 영향을 검토하기 위하여  $2.0 \times 10^{-2}$  농도로 만든 다음 같은 양의 효소액과 혼합한 다음 4°C에서 60분간 전처리 하여 효소활성을 측정한 결과 Table 3에서와 같이 현저한 활성의 저하를 보였다. 이는 Sugimoto 등<sup>13)</sup>, Garro 등<sup>19)</sup>, Chun 등<sup>11)</sup>의 결과와 같았으며 이러한 결과로 볼때 본 효소의 catalytic부위에 -SH기가 있다고 사료된다. 효소활성단이 histidine의 imidazole기인 경우 그 활성단을 저해하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 처리한 결과에서도 효소활성의 저하를 보여 주었다. 이는 Keum<sup>20)</sup>이 대두 및 *A. niger* 유래의  $\alpha$ -galactosidase의 활성에 관여하는 아미노산을 확인하기위해 수식시약을 가하여 효소활성을 측정했을 때 두 효소 모두 histidine잔기에 특이적으로 반응하는 DEPC시약과 작용하여 활성이 소실되었다는 결과와 동일하였다. 그의 iodine에서도 현저한 저하를 보여 주어 Sugimoto 등<sup>13)</sup>의 결과와 비슷한 양상을 보였으며, 효소의 활성단에 존재하는 carbonyl기와 공유결합하여 phenylhydrazide를 형성하여 효소의 활성을 저해하는 phenylhydrazine을 처리한 결과도 저해를 나타내었다. 이같은 결과로 볼 때 효소 활성에 histidine잔기와 carbonyl기 역시 관여하고 있다고 사료된다.

Table 3. Effect of various inhibitors on the activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*

Inhibitors	Relative activity (%)
None	100.0
2,4-dinitrophenol (2,4-DNP)	100.0
$\alpha$ -Aminocaproic acid	100.9
Sodium citrate	99.3
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	94.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	80.5
Phenylhydrazine	59.6
Chloromercuribenzoic acid (PCMB)	7.7

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml inhibitor solution (2 mM), was incubated at 4°C for 60 min and the residual activities were assayed.

Table 4. Effect of sugars on the activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*

Sugars	Relative activity (%)
None	100.0
D-glucose	97.6
D-galactose	93.1
D-fructose	98.9
Sucrose	97.8

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml sugar solution (2 mM), was incubated at 4°C for 60 min and the residual activities were assayed.

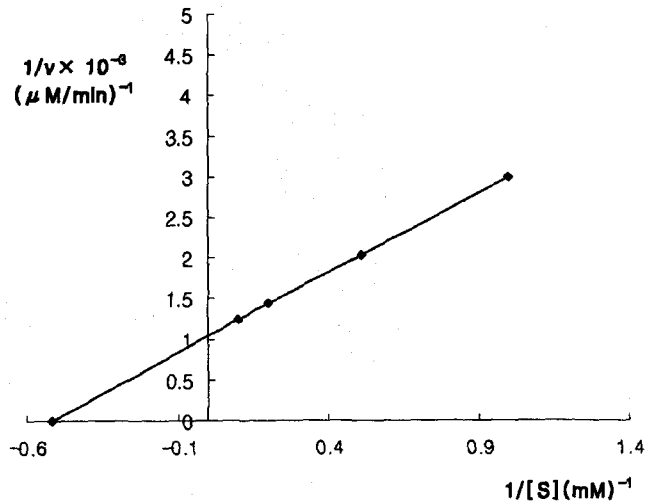


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of PNPG by  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*.

(5) 반응산물의 영향

효소 반응 생성물이  $\alpha$ -galactosidase 활성에 미치는 영향을 보기위해 당류를 최종농도가  $1 \times 10^{-2}$  M이 되도록 첨가하여 product inhibition을 조사한 결과 Chun 등<sup>11)</sup>이 D-fructose 30.8%, D-galactose 56.4%, D-glucose 56.4% 잔존 활성을 보였다는 결과와는 상이하였다. Keum<sup>20)</sup>의 galactose에 의해 저해되었으나 다른 당류에는 거의 영향을 받지 않았다는 결과 및 Sugimoto 등<sup>13)</sup>의 D-glucose에서 85% 잔존활성을 보였으며, D-galactose 97%, D-fructose 100%, sucrose 100%의 잔존활성을 나타내었다는 결과와는 유사한 것으로 본 효소는 반응산물의 영향을 거의 받지 않았다.

(6) 효소반응속도론

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 PNPG를  $0.5 \times 10^{-3} \sim 10 \times 10^{-3}$  M로 기질농도를 달리하였을

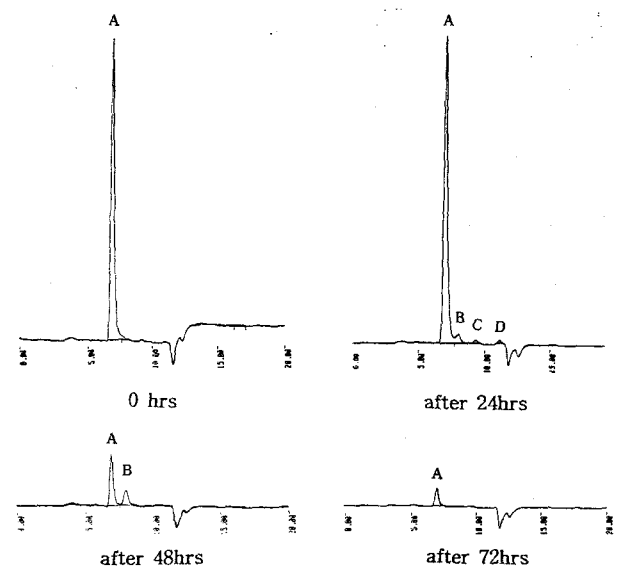


Fig. 9 HPLC pattern of sugar obtained at different times of cultivation. (A) Raffinose (B) Sucrose (C) Glucose (D) Fructose

때 효소활성의 변화를 측정 한 후 Lineweaver-Burk plotting 한 결과 Fig. 6에서와 같이 Km 값이 1.9 mM, Vmax값은  $9.66 \times 10^2 \mu\text{M}/\text{min}$ 이었다.

#### (7) 분해산물의 확인

효소 생산용 배지에 raffinose를 2% 넣은 후 배양 중 raffinose의 분해 양상을 보기 위해 배양간에 HPLC를 이용하여 당류의 변화를 살펴 본 결과 Fig. 9와 같이 배양초기에 raffinose가 분해되어 sucrose 및 glucose, fructose 등이 생성됨을 확인할 수 있었고 배양 기간이 지남에 따라 raffinose의 양이 줄어들며 sucrose 및 glucose, fructose 역시 소실되어 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생육할 때 raffinose를 분해하여 sucrose 및 glucose, fructose를 생산하며 이들 당류는 *Scopulariopsis brevicaulis* 발효시 탄소원으로 사용되어 소비되기 때문인 것으로 추정되며 raffinose의 유리된 galactose 역시 생육시 영양원으로 소비되어 관찰되지 않는 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술개발 사업의 연구비에 의하여 수행된 연구결과와 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Ju, H. K., S. K. Ro, and M. H. Im (1972) Studies on the fermentation of soy sauce by bacteria. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **4**(4), 276-284
- Kim, Z. U., S. H. Cho (1975) A study on the manufacturing of soysauce by the combined use of *Aspergillus sojae* and *Bacillus subtilis*. *J. Kor. Agri. Chem. Society*. **18**(1), 1-9
- Cho, M. J., Z. U. Kim (1971) Studies on the quick ripening process for soysauce. *J. Kor. Agri. Chem. Society*. **14**(1), 19-27
- Lee, W. J. and D. H. Cho (1971) Microbiological studies of korean native soy-sauce fermentation. *J. Kor. Agri. Chem. Society*, **14**(2), 137-148
- Seo, J. S., E. M. Han, T. S. Lee (1986) Effect of meju shapes and strains on the chemical composition of soybean paste. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **15**(4), 1-9.
- An, B. J., G. M. Son and C. Choi (1986) Changes in protein and amino acid composition of native meju during fermentation. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **15**(2), 152-157
- Choi, C., K. S. Choi, S. Kim, S. H. Lee, J. H. Son (1997) Characteristics and action pattern of protease from *Scopulariopsis brevicaulis* in korean traditional meju. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**(1), 56-61
- Tanaka, M., D. Thananunkul, T. Lee and C. O. Chichester (1975) A simplified method for the quantitative determination of sucrose, raffinose and stachyose in legume seeds. *J. of Food Sci.*, **40**, 1087-1088
- Cruz, R. and Y. K. Park (1982) Production of fungal  $\alpha$ -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. *J. of Food Science*, **47**, 1973-1975
- Kang, K. H., D. J. Kang, H. K. Min and S. I. Park (1994) Some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium angulatum* and *Bifidobacterium longum*. *Foods and Biotechnol.*, **3**(3), 160-164
- Chun, H. S. and S. R. Lee (1988) Production and enzymatic characteristics of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Kor. J. Foods Sci. Technol.*, **20**(1), 79-84
- Reddy, N. R. and D. K. Salunkhe (1980) Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend. *Cereal Chem.*, **57**(5), 356-360
- Sugimoto H. and J. P. Van Buren (1970) Removal of oligosaccharides from soy milk by an enzyme from *Aspergillus saitoi*. *J. of Food Science*, **35**, 655-660
- Cruz R., J. C. Baatistela, and G. Wosiacki (1981) Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soymilk processing. *J. of Food Science*, **46**, 1196-1200
- Keum, J. H., M. J. Oh and C. J. Kim (1991) Purification and properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(5), 477-486
- Chou C., F. M. Ho, and C. S. Tsai. (1988) Effects of temperature and relative humidity on the growth of and enzyme production by *Actinomyces taiwanensis* during Sufu Pehtza preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(3), 688-692
- Mckay A. M. (1991) Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -galactosidase during fungal growth on polygalacturonate. *J. of Food Science*, **56**(6), 1749-1750
- Annunziato M. E., R. R. Mahoney and R. E. Mudgett (1986) Production of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *J. of Food Science*, **51**(5), 1370-1371
- Garro, M. S., Graciela S. de Giori, Gracieia F. de Valdez and G. Oliver (1993) Characterization of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *J. of Appl. Bacteriology*, **75**, 485-488
- Keum, J. H. (1991) Enzymatic studies on the  $\alpha$ -galactosidase from soybean and *Aspergillus niger*, Ph. D. Thesis, *Chungnam national Uni. Taejon*, Kor.

---

**Characteristics and Action Pattern of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean Traditional Meju.**

Cheong Choi\*, Kwang-Soo Choi, Seon-Ho Lee, Seung-Pyo Hong, Hee-Duck Lee, Du-Kyung Bae(Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan, 719-749, Korea)

**Abstract** : The optimum culture condition of *Scopulariopsis brevicaulis* for the production of  $\alpha$ -galactosidase was as follows: Tryptone 1.5%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2%, Raffinose 2.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%, yeast extract 0.5%, pH 7.0, 27°C. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of  $\alpha$ -galactosidase producing *Scopulariopsis brevicaulis* were pH 7.0 and 27°C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 6.0~8.0 and at temperature below 40°C. The activity of the enzyme was inhibited by  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , *p*-chloromercuribenzoic acid and Iodine. These results would indicate the presence of -SH groups in the catalytic site of the enzyme. Km value was 1.9 mM for *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside and Vmax value was  $9.66 \times 10^2$   $\mu\text{M}/\text{min}$ . Sugar constituents of culture broth were identified by HPLC that the enzyme liberated sucrose, glucose and fructose from raffinose and raffinose was significantly decreased.

---

Key words : *Scopulariopsis brevicaulis*,  $\alpha$ -galactosidase, soy sauce

\*Corresponding author